Laboratorio virtual de electrofisiología LABVIE. Comportamiento eléctrico del axón gigante de calamar.

D'Alessandro-Martínez, A. (*), Silva-Bustillos, R.(**), Sutil-Rosas, A. (***) y Carbunaru, R. (****)

(*)Cátedra de Fisiología, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, UCV. AP: 50587(dalessaa@camelot.rect.ucv.ve). (**) Sección de Biofísica y Bioingeniería, USB. AP:89000 (rjsilva@usb.ve). (***) Hospital Militar Carlos Arvelo. (anisutil@LatinMail.com) (****) Grupo de Bioingeniería y Biofísica Aplicada, USB

Resumen

Los programas de estudio de bioingeniería, biología y medicina, contemplan prácticas de electrofisiología. La obtención de resultados experimentales adecuados requiere un arduo trabajo de laboratorio por parte del estudiante, la existencia del instrumental adecuado y los reactivos apropiados. Con el fin de disponer de una alternativa a esta situación o de complementar los experimentos realizados in vitro o in vivo se ha diseñado un Laboratorio Virtual de Electrofisiología (LABVIE) que comprende varias prácticas (y cada una de ellas con diversos experimentos) que se realizan a través del computador. En éste trabajo se presenta una de esas prácticas realizada mediante el programa ejecutable ACC7 (con programa fuente en Borland C++ 3.1 bajo windows) que consiste en estudiar el comportamiento eléctrico de la membrana celular del axón gigante de calamar.

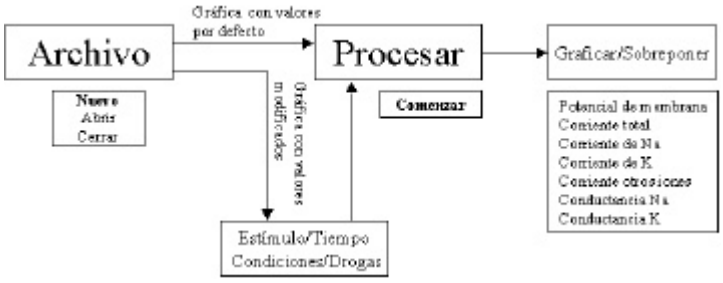
INTRODUCCIÓN

Los primeros modelos matemáticos para explicar la excitación de axones y la conducción del potencial de acción a través de ellos surgen en la década de 1930. En 1952, Hodgkin y Huxley, presentan unas ecuaciones empíricas para describir el comportamiento de la membrana del axón gigante del calamar basados en una serie de experimentos realizados con la técnica de voltaje controlado. Estas ecuaciones fueron posteriormente interpretadas en términos de canales con compuertas. Desde el surgimiento de las ecuaciones de Hodgkin y Huxley (1952) se han publicado diversos programas de computación para simular el comportamiento del axón gigante de calamar bajo diversas condiciones. Entre los más importantes están los programas publicados por Adelman (1971), Hobbie (1978), Randall (1980), Morán y col. (1986), además de otros programas comerciales: Axovacs (Axon instruments, Inc.), Neurosim (Biosoft) y Loligo Electronicus (Educe Education Technologies).

Utilizando las ecuaciones de Hodgkin y Huxley se diseñó un programa computacional (ACC7) que simula adecuadamente el comportamiento eléctrico de la membrana celular del axón gigante de calamar, y permite realizar diversos experimentos virtuales. El modelo empleado posee las siguientes características: En ausencia de estimulación, el axón presenta una diferencia de potencial eléctrico (entre su interior y el exterior) que puede variar, dependiendo de las variedades de calamares entre -50 y -75 mv (negativa en el lado axoplásmico y positiva en el lado intersticial). Esta diferencia de potencial se mantiene, en ausencia de estimulación, debido a la acción de la bomba sodio-potasio. Las conductancias en reposo, para el potasio y el sodio, son respectivamente, 10 μS y 0,5 μS, es decir, un factor 20 a favor del ión potasio. Cuando la membrana es estimulada eléctricamente, los canales de sodio se abren momentáneamente (0,3 ms) y se produce un influjo rápido del ión sodio que hace menos negativo y hasta invierte el potencial de membrana (fase de depolarización). Posteriormente, mientras estos canales se cierran, se abren más canales de potasio lo cual incrementa la salida de este ión, repolarizándose la membrana. Cuando el eflujo de potasio excede al influjo de sodio, la membrana retorna al potencial de reposo. Después de esto, durante unos pocos milisegundos, mientras ambas permeabilidades retornan a sus valores de reposo, la alta permeabilidad al potasio hiperpolariza la membrana, y posteriormente, debido a la acción de la bomba, se regresa de nuevo al potencial de reposo, en el cual permanece la membrana en ausencia de estimulación. Esta secuencia de eventos se conoce como potencial de acción (PA).

MATERIALES Y MÉTODOS

El programa ACC7, fue desarrollado en Borland C++ 3.1, en ambiente Windows, para complementar los experimentos realizados in vitro o in vivo por los estudiantes de los Laboratorios de Fisiología en la Universidad Central de Venezuela y en la Universidad Simón Bolívar (Venezuela). Los requerimientos mínimos para poder usar éste programa son una computadora PC compatible con microprocesador 80486 o superior que tenga instalado el ambiente Windows 3.1 o superior. El programa ACC7 permite realizar diversos experimentos virtuales. El usuario puede establecer las condiciones para la célula, para dos estímulos eléctricos externos con retardo entre ellos y la forma de presentación de las gráficas. El programa realiza iteraciones, utilizando el método de diferencias finitas. El programa presenta una pantalla principal con ocho ventanas desplegables: archivo, procesar, estímulos, tiempo, condiciones, drogas, graficar y sobreponer. Ellas están interrelacionadas de acuerdo al siguiente diagrama de flujo:



La opción nuevo en el menú ARCHIVO, permitirá al usuario establecer las condiciones presentes en la simulación, con los submenúes Estímulos, Drogas, Condiciones y Tiempo de la simulación. Se permite usar dos estímulos completamente independientes que se identifican como Estímulo 1 (E1) y Estimulo 2 (E2). Cada uno de estos es tratado como un pulso (de onda cuadrada) de corriente que se inyecta en la célula, es decir, entrada de cargas positivas al medio intracelular. Las condiciones del E1 que se pueden fijar son la duración y la intensidad. Ellas aparecen como Corriente Inyectada y Duración del pulso. En la simulación se considera que el E1 comienza en el instante inicial del proceso. Para el E2 se agrega además una característica adicional que es el Retardo. Este representa el tiempo que transcurre a partir del final de E1, antes de que el E2 se active. Con un manejo apropiado de las duraciones, intensidades y retardo de los estímulos es posible simular una gran variedad de experimentos que permitirá estudiar las características de las células nerviosas tales como los períodos refractarios y curva intensidad-duración (Berne y Levy, 1992), y la suma de estímulos subumbrales (Pérez y col., 1988).

Las condiciones son los parámetros celulares que aparecen en la ecuación de Hodgkin y Huxley para simular el potencial de acción. Con este submenú, dichas condiciones pueden ser modificadas a partir de sus valores por defecto. Estos parámetros son: Potencial de membrana en reposo; Potencial de equilibrio para el sodio; Potencial de equilibrio para el potasio; Potencial de equilibrio para otros iones; Conductancia máxima para el sodio; Conductancia máxima para el potasio; Conductancia para otros iones y Capacitancia de la membrana. Para cambiar el valor asignado a alguno de estos parámetros sólo hay que seleccionarlos dentro del submenú. Cuando se hace esto, aparece una ventana de diálogo donde se indica al usuario el parámetro, su valor actual y se le colocar un nuevo valor si así lo desea dentro del recuadro respectivo. En el submenú DROGAS se permite al usuario agregar Tetrodotoxina (TTX), para bloquear los canales de Na^+, y/o Tetraetilamonio (TEA), para bloquear los canales de K^+, en las concentraciones deseadas, para así poder simular el efecto de estas drogas sobre el potencial de acción. Al seleccionar cualquiera de estas opciones, aparecerá una ventana de diálogo que le permitirá al usuario introducir datos en el programa. El efecto de las drogas usadas en el programa recae directamente en las conductancias de los iones. Este efecto se simula utilizando en vez de las conductancias máximas gNamax y gKmax, las conductancias máximas en presencia de drogas. Así tendremos que (Morán y col.,1986):

$$gNa_{maxD} = gNa_{max} / (([TTX] / 5) + 1) \text{ y } gK_{maxD} = gK_{max} / (([TEA] / 5) + 1)$$

donde [TTX] y [TEA] son las concentraciones de tetrodotoxina (nanomolar) y tetraetilamonio (milimolar), respectivamente. Las convenciones que usa el programa para la corriente y el voltaje son: corriente positiva para la salida de cargas positivas (y/o entrada de cargas

negativas). El potencial de membrana es la diferencia de potencial eléctrico (voltaje) entre el medio intracelular y el extracelular. El programa presenta un sistema de Lectura Rápida de los valores graficados que permite conocer el valor y el instante de tiempo para la función graficada en algún punto. Para esto, solo se coloca el cursor del ratón en el punto deseado, y en la zona superior izquierda de la pantalla aparecen dichos valores. En el presente trabajo se reportan los resultados de una práctica de electrofisiología virtual que consistió en obtener los registros del potencial de acción y la evolución temporal de las conductancias de los iones sodio y potasio, primero, sin acción de drogas y luego con una concentración de TTX de 500 nM, la curva intensidad vs duración del estímulo, la determinación del período refractario absoluto y total, y la suma temporal de estímulos subumbrales.

RESULTADOS

Mediante el programa ACC7 se obtuvo la figura 1 (experimento 1) donde se presentan simultáneamente el PA y las conductancias normalizadas de los iones sodio y potasio, con las condiciones establecidas por defecto, excepto la duración del estímulo que fue de 1 ms. Este potencial presenta la forma típica del PA obtenido mediante la experimentación (Hodgkin y cols., 1952), con sus fases respectivas (despolarización, repolarización e hiperpolarización). Se observa el típico desplazamiento de los máximos de las conductancias de los iones potasio y sodio. El máximo de esta última coincide (aproximadamente), como ocurre experimentalmente, con el máximo del PA.

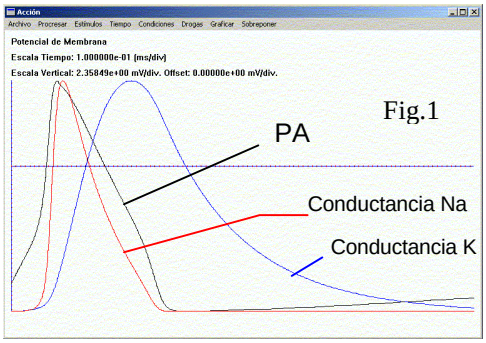


Fig.1

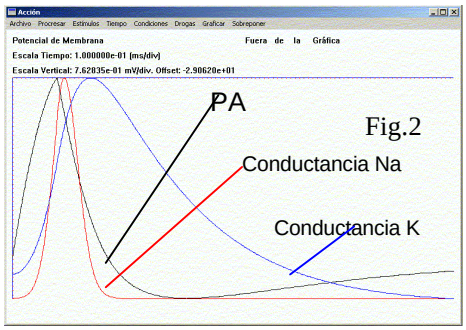


Fig.2

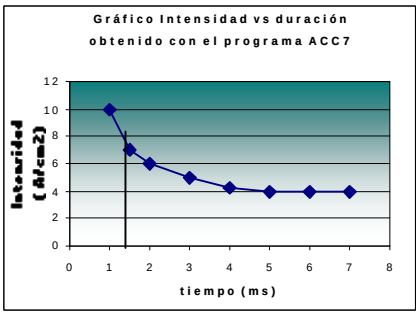


Fig.3

E1 ($\mu A/cm^2$)	D1 (ms)	E2 ($\mu A/cm^2$)	D2 (ms)	RETARDO (ms)	P.A.
10	0,5	10	0,5	0	SI
5	1	5	1	1	NO
5	1	5	1	0,5	NO
5	1	5	1	0,3	SI
8	1	8	1	3	NO
8	1	8	1	2,2	SI

Tabla

En la figura 2 (experimento 2) se observa el gráfico del PA y las conductancias normalizadas de los iones sodio y potasio, para una concentración de TTX de 500 nM. La comparación de este gráfico con el correspondiente al potencial de acción sin TTX (fig. 1) permite evidenciar que en el caso del PA con TTX no se alcanzan valores positivos (el máximo de despolarización está en -29,13 mV), mientras que en el caso del PA sin TTX el máximo de despolarización está en +43,4 mV. Las tasas de despolarización son para el PA sin TTX de 105,5 mV / ms y para el PA con TTX de 31,5 mV / ms, lo cual hace evidente el efecto de la TTX sobre el PA. Se observa además, la disminución del ancho de la curva de la conductancia del ión sodio y una caída más abrupta de la misma. En el experimento 3 se obtuvieron diversas intensidades mínimas para el E1 y la duración necesaria para producir un PA. El procedimiento que se siguió fue fijar la duración del E1 y variar la intensidad hasta obtener el valor mínimo (umbral) de ésta que dispara el PA, en función de ello se obtuvo la figura 3 (curva intensidad vs duración del estímulo) que permitió obtener la reobase (4 $\mu A/cm^2$) y la cronaxia (1,3 ms). Así mismo, se determinó el período refractario total (absoluto + relativo) aplicando dos estímulos sucesivos de igual intensidad y duración, cuyos valores fueron seleccionados mediante la curva intensidad-duración (10 $\mu A/cm^2$ y 1 ms); el PA idéntico al inicial se obtuvo después de un

retardo temporal de 15,1 ms y este valor constituye el período refractario total (experimento 4). Se determinó también el período refractario absoluto (experimento 5) utilizando un E1 (10 $\mu A/cm^2$, 1 ms) y un E2 con una intensidad suficientemente elevada (300 $\mu A/cm^2$, 1ms) para que inmediatamente después de finalizado el período refractario absoluto (PRA) pueda disparar el PA, con las mismas características que el inicial. El PRA obtenido fue de 8,2 ms. En la tabla se presentan los resultados obtenidos en el experimento 6 sobre la suma de estímulos subumbrales en donde se han utilizado los estímulos E1 y E2 con duraciones menores que las requeridas, según la fig.3, para producir cuando se aplican en forma aislada un PA.

DISCUSIÓN

La comparación de los experimentos 1 y 2 evidencia la influencia de la disminución de la conductancia al sodio (lo cual disminuye el flujo de iones positivos hacia la célula) sobre el PA, el cual no alcanza valores positivos y disminuye sensiblemente la tasa de despolarización. Como no se afecta la conductancia al potasio, la repolarización es normal. El experimento 3 permitió obtener el comportamiento típico hiperbólico de la curva intensidad vs duración reportado por Berne y Levy (1992). Los resultados de los experimentos 4 y 5 ponen de manifiesto la existencia en la membrana celular de un intervalo temporal (período refractario absoluto) durante el cual la membrana no produce potencial de acción por más intenso que sea el estímulo aplicado, luego de transcurrido este intervalo, comienza otro (período refractario relativo) durante el cual la membrana genera potenciales de acción con una magnitud mayor cuanto mayor sea la intensidad del estímulo aplicado. Los resultados del experimento 6 nos permiten concluir que aún cundo se apliquen a la membrana dos estímulos subumbrales en forma consecutiva, ellos pueden generar un PA siempre y cuando el retardo entre ellos sea suficientemente pequeño. La incorporación en el programa de dos pulsos (de intensidad y duración variables) con un retardo entre ellos aumenta grandemente la versatilidad del mismo cuando se le compara con los otros programas anteriormente mencionados, en los cuales existe únicamente un pulso. El programa presenta entre sus ventajas la estructura modular, una alta velocidad de procesamiento, la posibilidad de modificar por el usuario la mayoría de los parámetros celulares relevantes y la existencia de archivos ejecutables; y entre sus desventajas una capacidad gráfica y amigabilidad con el usuario intermedia. El programa se presenta como una excelente opción desde el punto de vista de costo-beneficio. Actualmente se trabaja en la implementación del programa en otras plataformas computacionales como Labview. Además se trabaja en la incorporación de elementos teóricos dentro de los programas, que permitan explicar los fundamentos teóricos y experimentales asociados con los eventos simulados.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede afirmar que el programa constituye una herramienta pedagógica adecuada para complementar o sustituir (cuando existan severas limitaciones) los experimentos electrofisiológicos reales reportados en este trabajo. La incorporación de dos pulsos con un retardo entre ellos incrementa la versatilidad del programa. Se hace necesario mejorar la capacidad gráfica, interactividad con el usuario e incorporar ventanas adicionales.

REFERENCIAS

Adelman, W.(1971). Biophysics and Physiology of excitable membranes. Van Nostrand Reinhold. E.U.A.

Berne, R. y Levy, M. (1992). Fisiología. Mosby. España.

Hobbie, R. (1978). Intermediate physics for medicine and biology. Wiley. E.U.A.

Hodgkin, A.L.; Huxley, A.F. y Katz, B. (1952). Measurement of current voltage relations in the membrane of the giant axon.of Loligo. J. Physiol (London). 116: 424-448.

Hodgkin, A. L y Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol (London). 117: 500-544.

Morán, O., Smith, J.E. y Requena, J. (1986). Generación del impulso nervioso: un modelo de simulación para microcomputadoras personales como herramienta auxiliar en la docencia universitaria. Interciencia. 11 (2),69-76.

Pérez, M., Portilla, N., Otazo, A. y Barro, P. (1988). Fisiología Experimental. Pueblo y Educación. La Habana.

Randall, J.E. (1980). Microcomputers and physiological simulation. Addison-Wesley. E.U.A.